

Prof. dr hab. Magdalena Chadzińska
Zakład Immunologii Ewolucyjnej
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
Ul. Gronostajowa, 930-387, Kraków
tel. 0126645068, email: magdalena.chadzinska@uj.edu.pl

Kraków, 09.01. 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kamili Wiśniewskiej pt. „Potencjał immunologiczny hemolimfy pająka *Steatoda grossa* (Theridiidae) w warunkach długotrwałej ekspozycji na wybrane metale podawane drogą pokarmową”.

Rozprawa doktorska mgr Kamili Wiśniewskiej jest bardzo ciekawym opracowaniem z zakresu immunotoksykologii pająków i doskonale wpisuje się w tematykę badawczą od lat rozwijaną z sukcesem w grupie badawczej kierowanej przez promotorkę niniejszej rozprawy dr hab. Grażynę Wilczek, prof. UŚ.

Celem pracy był zbadanie wpływu długotrwałej ekspozycji samic pająka *Steatoda grossa* na subletalne dawki, podawanych drogą pokarmową, kadmu i miedzi na: (i) ilościowe i jakościowe zmiany hemocytów, (ii) zmiany w proteomie hemolimfy, w tym na poziom białek cekropino- i defensyno-podobnych i metalotionein.

Praca ma tradycyjną formę i składa się ze wstępu (27 stron), opisanych na 2 stronach celi pracy i hipotez badawczych, rozdziału opisującego metodykę badań (18 stron), bogato ilustrowanego rozdziału wyniki oraz z 28-stronnicowej dyskusji. Pracę, liczącą 135 stron, zamyka spis literatury (135 pozycji) i aneks zawierający szczegóły porównań statystycznych.

Streszczenia napisane są poprawnie, chociaż wstawienie do nich tabeli z metodami użytymi w pracy wydaje mi się zbędne.

Wstęp, cele pracy i hipotezy badawcze:

Wstęp napisany jest jasno i zwięźle i bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia ekotoksykologii ze szczególnym uwzględnieniem, badanego w pracy, wpływu na organizmy żywe kadmu i miedzi. Następnie Autorka charakteryzuje układ odpornościowy pająków, w tym występujące u nich typy hemocytów i białka antybakteryjne.

Po wstępie znajdujemy jasno zarysowane cele pracy i szczegółowe, może nawet nieco zbyt szczegółowe, hipotezy badawcze.

Do tej części pracy wkrały się drobne błędy lub nieścisłości, które przytaczam z obowiązku recenzenta.

- 1) Hemolimfy nie można nazwać organem, jest to płyn ustrojowy lub, analogicznie do tego jak mówimy o krwi kręgowców, tkanka
- 2) Fotografia 1 (jak zresztą wszystkie inne zdjęcia zawarte w pracy) powinna być opatrzona skalą, wtedy w jej/fich opisie nie byłaby potrzebna informacja o zastosowanych powiększeniach. Jeśli już się je podaje to bardziej prawidłowe byłoby dodanie, że chodzi o powiększenie obiektywu i dodanie jego apertury numerycznej.

Metodyka

Na rozdział „Materiały i metody” składają się 4 podrozdziały opisujące: charakterystykę gatunku, warunki hodowli pajaków, opis doświadczenia, metody użyte do analizy poziomu metali i parametrów immunologicznych, w tym dokładny opis analizy składu białkowego hemolimfy. W ostatniej części Autorka opisuje testy zastosowane do analiz statystycznych. Ta część pracy ilustrowana jest między innymi przejrzystym schematem obrazującym metodę intoksykacji pajaków. Zabrakło mi na nim jedynie wprowadzenia nazw związków kadmu i miedzi, na działanie których narażone były muchy i karmione nimi pająki. Z kolei w opisie ryciny 3 nie są wyjaśnione skróty zawarte na schemacie.

W rozdziale 3.3. podano, że zwierzęta otrzymywały zawiesinę bakteryjną w postaci 1 μg zliofilizowanej masy bakteryjnej w NaCl, nie znalazłam tam natomiast opisu procesu liofilizacji.

Zgodnie z logiką i kolejnością wykonywania oznaczeń rozdział opisujący jak dokonano pomiaru całkowitego stężenia białka (obecnie 3.4.7.) powinien poprzedzać rozdziały opisujące ilościową ocenę białek cekropino-podobnych, defensyno-podobnych (rozdział 3.4.5.) i metalotionein (rozdział 3.4.6.).

W tym miejscu chciałabym podkreślić, że w swoich badaniach Doktorantka zastosowała bardzo szeroki panel nowoczesnych technik badawczych, począwszy od analizy stężenia metali w próbkach, poprzez analizy mikroskopowe (mikroskop świetlny i transmisyjny mikroskop elektronowy) i cytometryczne hemocytów, po ilościowe i jakościowe analizy proteomu hemolimfy. Biorąc pod uwagę, że pająki nie są konwencjonalnymi zwierzętami modelowymi w badaniach immunologicznych, należy podkreślić, że tego typu badania są

często trudne i wymagają każdorazowego czasochłonnego dostosowanie metodyki badawczej do tego typu materiału.

Wyniki

W rozdziale tym Doktorantka szczegółowo opisuje uzyskane wyniki. Rozdział ilustrowany jest: 8 tabelami (w tym bardzo rozbudowaną tabelą zestawiającą białka zidentyfikowane w hemolimfie pająka przy pomocy spektrometrii mas), 3 tablicami ze zdjęciami hemocytów pająka, 3 mapami białkowymi (szkoda, że ryciny 10 i 11 zostały zamieszczone na oddzielnych stronach), 1 ryciną z reprezentatywnym żelem wskazującym białka o zmienionej aktywności oraz 7 wykresami obrazującymi liczbę i skład hemocytów oraz poziom w hemolimfie pajaków białek cekropino-podobnych, defensyno-podobnych i metalotionei. W przypadku wszystkich wykresów legendy mogłyby być nieco większe i bardziej staranne.

Wyniki są oryginalne i bardzo ciekawe, w ich opisie razi mnie jednak, że Doktorantka w wielu miejscach opisuje jako wzrosty lub spadki wartości różnice, które nie były istotne statystycznie. Moim zdaniem nie jest to uprawnione nawet jeśli zaznaczy się (tak jak czyni to Autorka rozprawy), że zmiany nie wykazywały różnic istotnych statystycznie. Czasami w literaturze spotykamy się z informacją o pojawiającej się tendencji, jednak mówimy o tym najczęściej w przypadku kiedy p mieści się w zakresie od 0.05 do 0.1.

Żałuje też nieco, że ryciny przedstawiające liczbę i skład hemocytów nie zostały dodatkowo zilustrowane reprezentatywnymi obrazami z cytometru przepływowego.

Szczególnie ciekawe i doskonale się wpisujące w bieżące tendencje badawcze są wyniki dotyczące analizujące skład białkowy hemolimfy.

W tej części pracy znalazłam drobne uchybienia językowe, które wymieniam jedynie z obowiązku recenzenta:

Strona 57 – zamiast słowa „granule” lepiej użyć po prostu słowa „ziarnistości”

Strona 62 i 65 – niefortunne wydaje mi się sformułowanie „...białka znajdujące się w supresji lub w nadekspresji..”

Strona 70, w zdaniu rozpoczynającym się od „Podobnie wimentyna..” brakuje orzeczenia.

Dyskusja

W dyskusji znajdujemy wyczerpujące i rzeczowe omówienie otrzymanych wyników na tle dostępnej literatury a podział tego rozdziału na 7 podrozdziałów bardzo ułatwia śledzenie toku rozumowania Autorki. Dyskusja napisana jest w sposób dojrzały i świadczy o bardzo

dobrej znajomości tematyki immunotoksykologicznej przez Doktorantkę. Moim zdaniem rozdział ten zyskałby na zamieszczeniu schematu podsumowującego uzyskane wyniki.

Na stronie 86 znalazła się uwaga, że zmniejszenie całkowitej liczby hemocytów w warunkach narażenia na metale może być konsekwencją ich lizy. Nie można wykluczyć, że pod wpływem metali dochodzi do apoptozy hemocytów, co nie jest związane z lizą komórek. Zatem bezpieczniej byłoby chyba stwierdzić, że chodzi tu o śmierć komórek, a jaki był to rodzaj śmierci komórkowej należałoby wyjaśnić w odrębnych badaniach.

Strona 89 – Autorka wymienia PMA jako jeden z mitogenów. Ester forbolu jest aktywatorem kinazy białkowej C (PKC) i czynnikiem używanym do stymulacji wybuchu tlenowego. Związek ten, aczkolwiek w niektórych układach eksperymentalnych stymuluje proliferację komórek, nie do końca jest jednak typowym mitogenem.

Strona 90 - poly I:C nie jest analogiem wirusa tylko wirusowego dwuniciowego RNA.

I znowu z obowiązku recenzenta wymieniam, nieliczne, potknięcia językowe jakie znalazłam w tym rozdziale:

Str 83 – co Autorka rozumie pod pojęciem „kondycji immunologicznej”?

Str 89 – mówimy raczej o poziomie lub stężeniu niż o „zawartości” reaktywnych form tlenu.

Strona 90 – mówimy o liczbie lub procentowym udziale granulocytów, a nie o ich „zawartości”

Strona 91 – zgodnie ze słownikiem języka polskiego słowo „deprymować” oznacza wprawiać w stan zakłopotania, niepewności lub zniechęcać, przygnębiać. A zatem w opisywanym przypadku chodziło chyba o „deprywację pokarmową”.

Strona 97 – można było znaleźć lepsze niż „unicestwiało” słowo na działanie przeciwwirusowe.

Strona 98 – niefortunne jest sformułowanie, że „Migracja komórek może sprzyjać aktywności białek cytoszkieletu”.

Dyskusję kończy lista 9 wniosków. Są one logiczne i zasadne.

Strona edytorska pracy

Praca jest starannie edytowana ale zapewne z uwagi na jej duży rozmiar wkradły się do niej pewne błędy literowe, stylistyczne i interpunkcyjne a także niezręczności językowe, o których wspominałam już powyżej. Dość dowolnie odnosi się też Autorka do kwestii umieszczania spacji przed i po myślniku/łączniku.

Wnioski końcowe

Rozprawę doktorską Pani magister Kamili Wiśniewskiej oceniam wysoko, a moje nieliczne drobne krytyczne uwagi w niczym nie obniżają jej bardzo dobrej oceny. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa ta spełnia warunki określone w artykule 14 ust. 2 pkt 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz.U z 2017 r., poz. 1789) oraz w artykule 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669).

Zwracam się zatem z wnioskiem do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani magister Kamili Wiśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie mając na uwadze szeroki zakres stosowanych technik badawczych oraz nowatorstwo i oryginalność uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Z poważaniem,

